

PATENT APPLICATION

8/3

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of

Akio KOBAYASHI et al.

Application No.: 10/041,633

Filed: January 10, 2002

Docket No.: 111632

For: METHOD FOR PROCESSING CELLS

CLAIM FOR PRIORITY

Director of the U.S. Patent and Trademark Office
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign applications filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

Japanese Patent Application No. 2001-008522 filed January 17, 2001; and

Japanese Patent Application No. 2001-349532 filed November 15, 2001.

In support of this claim, certified copies of said original foreign applications:

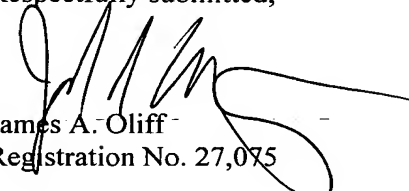
 X are filed herewith.

 were filed on in Parent Application No. filed .

 will be filed at a later date.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of these documents.

Respectfully submitted,


James A. Oliff
Registration No. 27,075

Joel S. Armstrong
Registration No. 36,430

JAO:JSA/zmc

Date: April 19, 2002

OLIFF & BERRIDGE, PLC
P.O. Box 19928
Alexandria, Virginia 22320
Telephone: (703) 836-6400

**DEPOSIT ACCOUNT USE
AUTHORIZATION**
Please grant any extension
necessary for entry;
Charge any fee due to our
Deposit Account No. 15-0461



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 1月17日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-008522

[ST.10/C]:

[JP 2001-008522]

出 願 人

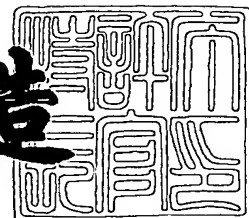
Applicant(s):

大阪大学長

2002年 2月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3009370

【書類名】 特許願

【整理番号】 U2000P130

【提出日】 平成13年 1月17日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 細胞の加工方法

【請求項の数】 11

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府豊中市上野坂 1-10-22

 【氏名】 小林 昭雄

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市阿倍野区晴明通 2 番 2 1 タウンハウス晴明 3 A

 【氏名】 福井 希一

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府高槻市上土室 3-29-2

 【氏名】 原島 俊

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府吹田市佐竹台 4-4-2

 【氏名】 福崎 英一郎

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府高槻市日吉台四番町 19-12

 【氏名】 梶山 慎一郎

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府茨木市下中条町 1-4 清風荘 12 号

 【氏名】 奥田 伸哉

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原 1-19-23-1108

 【氏名】 庄司 猛

【特許出願人】

【識別番号】 391016945

【氏名又は名称】 大阪大学長 岸本 忠三

【代理人】

【識別番号】 100072051

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】 100059258

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 暁秀

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709713

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞の加工方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞あるいは生組織に光ファイバーを介してレーザー光を照射し、照射された細胞の、細胞壁及び/又は細胞膜あるいは細胞全体を、切断、除去又は開孔することを特徴とする細胞の加工方法。

【請求項 2】 前記レーザー光の波長が500nm以下である請求項1記載の方法。

【請求項 3】 前記レーザー光の照射を、反射集光により行うことを特徴とする請求項 1 ～ 2 項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 4】 前記反射集光を、石英ガラスチップを介して行うことを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 当該石英ガラスチップの表面を金属コーティングしたことを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 コーティングする金属が、アルミニウム、白金、金、パラジウムおよび/またはこれらの酸化物からなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする請求項 5 項記載の方法。

【請求項 7】 レーザーが、YAGレーザー、エキシマレーザー、Arイオンレーザー、窒素レーザー、窒素励起レーザーからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする請求項1～6項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】 前記レーザー光を照射後、該照射部位を介して前記細胞及び/又は生組織内へ外来物質を導入することを特徴とする請求項1～7項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】 外来物質が、遺伝物質、タンパク質、オルガネラ、生理活性物質、指示薬からなる群から選択される少なくとも1種である請求項 8 記載の方法。

【請求項 1 0】 遺伝物質が、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、プラスミド、染色体、人工染色体、オルガネラDNA、核酸アナログからなる群から選択される少なくとも1種である請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 1】 請求項 1 0 記載の方法を用いて細胞内へ遺伝物質を導入した、形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞および、生組織の加工方法に関し、特に光ファイバーを介したレーザー光照射により細胞及び/または生組織を加工する生体試料加工法に関する。

【0002】

【従来技術】

従来のレーザー光を用いた生体の加工方法としては、例えば、医療用のレーザーメスや、顕微鏡の対物レンズを通して染色体などの試料にレーザー照射を行い、照射部を切断するレーザーマイクロディセクション法などの方法が知られている。また、レーザーを用いた遺伝子等の外来物質を細胞に導入する方法としては、特公昭62-7837のごとき方法が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

近年、バイオテクノロジーの進歩に伴い、特定組織の特定細胞をターゲットとした、細胞微細加工への要望が高まってきている。たとえば、植物の場合には、茎頂組織や、根端組織等の分裂組織中の細胞に、外来物質導入用の細孔をあけ、そこより外来物質を細胞内へ直接導入することにより、脱分化・再分化を経ないダイレクトな形質転換体の作製等も考えられ、脱分化、再分化系が確立されていない多くの有用植物の分子育種が期待される。また、このような細胞加工が可能となれば、遺伝子のみならず、葉緑体、核、染色体、ミトコンドリアなどのオルガネラ、生理活性物質や指示薬、あるいは機能性タンパク質といった遺伝子以外の外来物質の細胞への導入も可能となり、疾病の診断や治療、各種耐性を付与した農作物の分子育種、家畜を含む有用生物の生産等が可能となる。

【0004】

このような観点からすると、従来のレーザー生体加工法のうち、レーザーメス法は、出力が大きい反面、熱損傷が大きく細胞に与えるダメージが大きいため、細胞壁及び/または細胞膜の除去といった1細胞レベルでの微細加工はできない

という問題点を有する。また、レーザーマイクロディセクション法は、1細胞レベルでの加工が可能であるが、顕微鏡下対物レンズを通してレーザー照射を行うため、切片を作製するなど、照射に際して、試料の前処理を必要とし、茎頂の分裂組織など複雑な3次元形状を有する植物体そのものに、レーザーを照射して、外来物質の導入を行うための加工を施すことはできないという問題点を有する。さらに、レーザーを用いない外来物質導入法としては、マイクロインジェクション法、リポソーム融合法、エレクトロポレーション法などがあるが、エレクトロポレーション法と、リポソーム融合法は、植物細胞に適応する場合、プロトプラスト化する必要があるため、特定の組織の特定の1細胞に外来物質を導入することは困難であるという問題点を有する。マイクロインジェクション法は、動物細胞よりも堅固な細胞壁を有する植物細胞について操作をするには熟練を要求され困難を極めるという問題点を有している。

【0005】

したがって、操作が容易で、生物種を選ばず、汎用性を有し、さらには、複雑な3次元形状を有する生体組織の特定の部位あるいは細胞に外来物質を導入させるための微細加工をすることができる方法の開発が望まれていた。しかしながら、このような細胞の加工方法は、これまで知られていない。

【0006】

そこで、本発明の目的は、レーザー光の持つ高い加工特性、及び光ファイバーの特性を利用して、細胞を加工する方法を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために研究した結果、レーザー光の持つ高い加工特性、及び光ファイバーの特性を利用して、細胞、特に複雑な3次元形状を有する組織の適切な位置に加工を施すことができることを見出し、本発明を達成するに至った。

【0008】

即ち、本発明の細胞の加工方法は、細胞に光ファイバーを介してレーザー光を照射し、該細胞または生組織の細胞壁及び/又は細胞膜を、切断、除去又は開孔

することを特徴とする。

【 0 0 0 9 】

本発明の細胞の加工方法の好ましい実施態様において、前記レーザー光の波長が500nm以下であることを特徴とする。

【 0 0 1 0 】

本発明の細胞の加工方法の好ましい実施態様において、前記レーザー光の照射を、反射集光により行うことを特徴とする。

【 0 0 1 1 】

本発明の細胞の加工方法の好ましい実施態様において、前記反射集光を、石英ガラスチップを介して行うことを特徴とする。

本発明の細胞の加工方法の好ましい実施態様において、当該石英ガラスチップの表面を金属コーティングしたことを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

本発明の細胞の加工方法の好ましい実施態様において、コーティングする金属がアルミニウム、白金、金、パラジウムおよび/またはこれらの酸化物からなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【 0 0 1 3 】

本発明の細胞の加工方法の好ましい実施態様において、レーザーが、YAGレーザー、エキシマレーザー、Arイオンレーザー、窒素レーザー、窒素励起レーザーからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

本発明の細胞の加工方法の好ましい実施態様において、前記レーザー光を照射後、前記細胞の細胞膜及び/又は細胞壁の一部に穿孔を設け、前記細胞内へ前記穿孔から外来物質を導入することを特徴とする。

【 0 0 1 5 】

本発明の細胞の加工方法の好ましい実施態様において、外来物質が、遺伝物質、タンパク質、オルガネラ、生理活性物質、指示薬からなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【 0 0 1 6 】

本発明の細胞の加工方法の好ましい実施態様において、遺伝物質が、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、プラスミド、染色体、人工染色体、オルガネラDNA、核酸アナログからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【0017】

本発明の形質転換体は、請求項9記載の方法を用いて細胞内へ遺伝物質を導入して得たことを特徴とする。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明の細胞の加工方法は、細胞に光ファイバーを介してレーザー光を照射し、前記細胞の細胞壁及び/又は細胞膜を、切断、除去又は開孔する。なお、本発明の対象となる細胞としては、動物細胞、植物細胞、微生物等を挙げることができ、特に限定されない。

【0019】

本発明においては、光ファイバーを用いる。本発明において、光ファイバーを用いる理由は、光ファイバーによってレーザー光の照射方向、集光性、照射角度等を容易に制御することができるからである。

【0020】

本発明に適用できる光ファイバーとしては、特に限定されないが、紫外域レーザーの透過率が高いものが好ましい。レーザーの波長により光ファイバーの透過率が異なるので、所定の波長を有するレーザー光に対応して、透過率の高いものが好ましい。透過率の高いものとしたのは、レーザーのエネルギーを低下させないようにするためである。

【0021】

また、光ファイバーのコア材料としては、①レーザー光を効率よく透過するような透過率を持つ材料であること、②導入するレーザー光のエネルギーにより破壊されない強度を持つこと、が必要とされる。

【0022】

光ファイバーの透過率は、用いるレーザーの波長によって異なる。レーザーの波長が500nm以下の場合には、好ましい透過率は、1メートル当たり、10～60%で

ある。更に好ましくは、1メートル当たり30～60%である。光ファイバーの透過率をあげるには、石英中に水酸基を導入し、石英中の水酸基量を増加させることにより行うことができる。このように水酸基の量を調節することにより、所望の透過率に設定することができる。

【 0 0 2 3 】

レーザーの波長が500nmを超える場合、好ましい透過率は、1メートル当たり、70～90%である。

本発明に用いるレーザーは、特に限定されない。レーザーは、極めて集光性に優れ、しかもレーザービームスポット以外の部分へは、熱影響がほとんど無いという点で優れている。レーザーとしては、例えば、YAGレーザー、エキシマレーザー、Arイオンレーザー、窒素レーザー、窒素励起レーザー等を挙げることができる。加工細胞の熱損傷が特に少なく、加工精度が優れ、照射エネルギー及び照射回数によって加工深度を容易に制御することができるという観点から、好ましくは、エキシマレーザーである。

【 0 0 2 4 】

細胞へのレーザーの照射条件については、細胞の種類によって適宜変更することができる。

レーザースポット径としては、例えば、0.5～100 μm の範囲である。好ましくは、2～10 μm の範囲である。かかる範囲としたのは、照射後の外来物質を照射するのに十分な大きさであり、かつ、細胞へのダメージが少ないからである。

【 0 0 2 5 】

レーザーのエネルギー密度についても特に限定されないが、1～100 mJ/cm^2 の範囲である。好ましくは、30～80 mJ/cm^2 の範囲である。かかる範囲としたのは、1 mJ/cm^2 未満では、細胞壁が十分加工できない場合があり、100 mJ/cm^2 を超えると、レーザーが細胞膜を貫通し、細胞へのダメージが大きいからである。

【 0 0 2 6 】

レーザーの出力としては、1～1000 mJ/cm^2 の範囲である。好ましくは、10～100 mJ/cm^2 の範囲である。

レーザー光の照射によって、得られる穿孔の大きさは、導入する外来物質の大

きさにもより特に限定されない。例えば、穿孔の大きさは、 $1\sim 1000\mu\text{m}^2$ 程度である。オルガネラなどを比較的大きい物体を導入する場合には、 $100\sim 1000\mu\text{m}^2$ 程度である。遺伝物質など比較的小さい物質を導入する場合には、 $1\sim 100\mu\text{m}^2$ 程度である。

【0027】

また、レーザーの波長に関して、加工精度を高めること、及び細胞になるべくダメージを与えないこと等を考慮すると、短い波長のレーザーを使用することが好ましい。例えば、500nm以下のものが好ましい。

【0028】

上述の条件で、レーザー光を照射し、細胞の細胞膜及び／又は細胞壁の一部に穿孔を設け、前記細胞内へ前記穿孔から外来物質を導入することができる。また、細胞の細胞膜及び／又は細胞壁の一部又は全部を、切断又は除去することにより、細胞をプロトプラスト化又はスフェロプラスト化することができる。本発明においては、光ファイバーを介してレーザー光を照射するので、複雑な組織中にある特定細胞のみ、プロトプラスト化等することもでき、かかる細胞のみを形質転換させることも可能である。

【0029】

レーザー光を、光ファイバーに直接導入しても良いが、より集光性を高めるために、レーザー光を、一旦レンズにより集光した後、光ファイバーに導入しても良い。

【0030】

また、本発明においては、レーザー光の照射を、反射集光により行うことができる。光ファイバーを介してレーザー光を照射する場合には、エネルギー密度が低くなる。このため反射集光を用いてエネルギー密度を向上させることができる。エネルギー密度を収束させるには、ガラスチップ、石英チップなどをファイバーの先端に設ける事により達成することができる。また、エネルギー密度を効率よく収束させるには、該ガラスチップ、石英チップの表面をアルミニウム、金、白金、パラジウム等の金属および/またはこれらの酸化物によりコーティングする事により達成することができる。

【0031】

上述のように本発明の外来物質の導入方法は、他種または同種生物の核や染色体等のオルガネラ、あるいは人工的に作製した染色体等の巨大DNAを導入することが可能である。従って、これまで困難であった多重遺伝子の一括導入が可能であり、例えば、有用生理活性物質の生合成に関与する遺伝子群を一括して導入することにより、生育の早い生物で、有用生理活性物質を効率的に生産することなどが可能となる。

【0032】

また上述のように本発明の外来物質の導入方法は、植物ホルモンを植物に導入することができる。したがって、導入部付近の組織の成長を制御したい場合、本発明の外来物質の導入方法により、インドール酢酸、ナルタレン酢酸などのオーキシシン、ゼアチン、カイネチンなどのサイトカイニン、アブシジン酸、ジベレリン、ペプチド性ホルモンなどを、植物細胞に導入すれば、植物特定部位の成長を制御することができる。

【0033】

同様に、ファイトアレキシンなどの抗菌性物質、より具体的には、ピサチン、ファゼオリン、メジカルピン、リシチン、リシチノールなどを導入することで病原菌に感染しやすい組織の病害耐性を向上させることができる。また、ファイトケラチン、グルタチオンなどの活性酸素除去剤を加えることで葉などの受光組織でのUVや光、根部での重金属などのストレスに対する耐性を向上させることもできる。

【0034】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明は、下記実施例に限定されて解釈される意図ではない。

【0035】

① 石英キャピラリーの作製

SUTTER INSTRUMENT COMPANY (S.I.C) 社の石英カラス管Q100-70-10をS.I.C社のP-2000 laser powered quartz micropipette puller を用いてキャピラリーを

作製した。

【0036】

② 石英キャピラリーのアルミニウム蒸着

①で作製した石英キャピラリーに対して、蒸着源にアルミニウム（ニラコ社製、純度99.999%）を用いて、真空蒸着装置（真空機構株式会社製）により、表面にアルミニウム蒸着を施した。アルミニウムの蒸着の厚さは、約200nmに調製した。石英キャピラリーは、完全に蒸着されるように120度ずつ、3回に分けて蒸着操作を行った。

【0037】

③ 特殊石英ファイバーへの193nmレーザー光導入

通常の石英ファイバーに水酸基をドーブした特殊石英ファイバーに193nmのレーザー光を導入した。直径200 μ mのファイバーの出口におけるレーザーエネルギー密度を測定したところ、2 μ Jであった。

【0038】

④ ②で作製したアルミニウム蒸着石英キャピラリーによるレーザー光の集光

③の特殊石英ファイバーの出口に②のアルミニウム蒸着石英キャピラリーを装着した。キャピラリーの先端から放出されるレーザーエネルギーは、25nJであった。図1は、アルミ蒸着石英キャピラリーの概念図を示す。

【0039】

⑤ ②のアルミニウムを蒸着した石英キャピラリーを装着した特殊石英ファイバーをエッペンドルフ社製3次元マニピュレーターに取り付け、レーザー照射部位を3次元空間を自由に移動できるようにした。図2は、フレキシブルファイバー照射系の概略図を示す。

【0040】

⑥ タマネギ表皮細胞のレーザー照射による加工

2日間水耕栽培したタマネギから表皮細胞を剥ぎ取り、MS寒天培地上に置床した。加工したい標的細胞を顕微鏡下で選び、エッペンドルフ社製の3次元マイクロマニピュレーターに取り付けたレーザー照射部位を標的細胞に接触させ、60秒間、10Hzでレーザーを照射した。その結果、標的細胞の細胞壁を取り除いた。照

射後の細胞壁の加工形状を顕微鏡により観察し、細胞壁が効率的に除去されていること、他の組織にダメージを与えていないことを確認した。図3は、レーザー照射により加工されたタマネギ表皮の形状を示す図である。さらに、照射後の細胞を24時間培養した後、MTTを用いた生死判定により、照射細胞が生存していることを確認した。

【0041】

【発明の効果】

本発明の細胞の加工方法によれば、物質導入及び遺伝子導入による形質転換植物の作出において、特定の細胞あるいは細胞群を標的として用いることができるという有利な効果を奏する。

【0042】

本発明の細胞の加工方法によれば、レーザー照射加工する標的植物種及び/または、標的組織が限定されないことから、汎用性が高いという有利な効果を奏する。

【0043】

本発明の細胞の加工方法によれば、光ファイバーによって、照射角度を制御することができるので、細胞の適切な位置において、生体膜の切断、除去、又は開孔を行うことができるという有利な効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

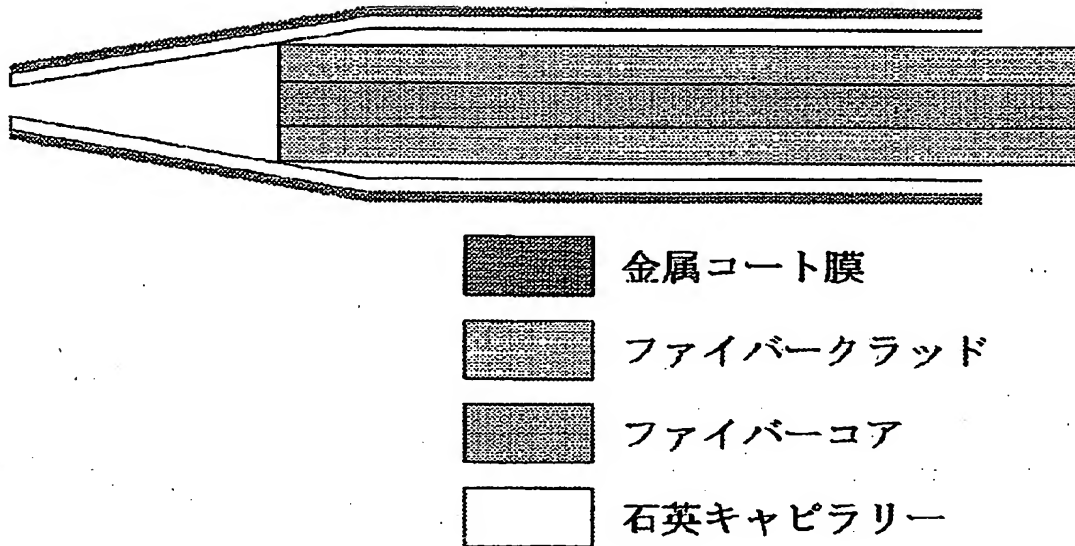
【図1】 アルミ蒸着石英キャピラリーの概略図である。

【図2】 フレキシブルファイバー照射系の概略図である。

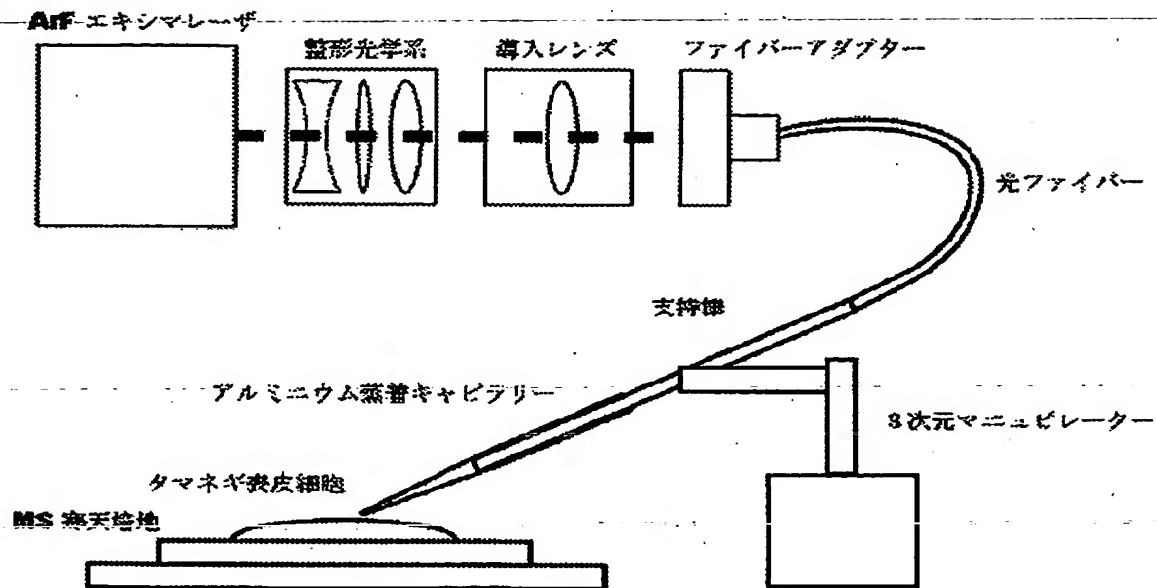
【図3】 レーザ照射により加工されたタマネギ表皮の形状を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

レーザー光の持つ高い加工特性、及び光ファイバーの特性を利用して、細胞を加工する方法を提供することである。

【解決手段】

本発明の細胞の加工方法は、細胞に光ファイバーを介してレーザー光を照射し、前記細胞の細胞壁及び/又は細胞膜あるいは細胞全体を、切断、除去又は開孔することを特徴とする。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-008522
受付番号	50100055343
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成13年 1月18日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	391016945
【住所又は居所】	大阪府吹田市山田丘1番1号
【氏名又は名称】	大阪大学長

【代理人】

申請人

【識別番号】	100072051
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】	100059258
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 暁秀

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [391016945]

1. 変更年月日 1991年 1月31日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府吹田市山田丘1番1号
氏 名 大阪大学長